

游离 DNA 提取试剂盒

一、产品简介

游离DNA(或称循环DNA, 以下简称cfDNA)是一种无细胞状态的、片段化的胞外DNA, 存在于血液、滑膜液和脑脊液等体液中, 主要以为核小体的形式存在^[1], 片段长度主要为178 bp及其倍数。cfDNA在正常人的血液中含量甚微, 平均值为13 ng/ml^[2], 而当机体在一些特殊状态时(如患有肿瘤、自身免疫性疾病、感染性疾病、中风、心肌梗塞及妊娠等), 其含量明显上升, 比如恶性肿瘤患者平均值达到180ng/ml^[2]。

适合处理的样品为血清、EDTA-K₂、EDTA-K₃或ACD抗凝的血浆, 不适合处理肝素抗凝的血浆。

提供负压抽滤和离心过滤两种方式回收 DNA:

DK607-01 (50 次): 负压抽滤, 最大处理体积为 4 ml, 轻松获得≥30 ng cfDNA。

DK607-S-50 (50 次): 离心过滤, 每次处理 200 μl 样品, 以孕妇血浆为例, 可获得 0.8-3.2 ng cfDNA。

DK607-T-4 (4 次): 同时提供负压抽滤的方式和离心过滤两种方式。

- ◆ Buffer CFDA可作为样品保存液, 方便分次采样和样品的异地运输(见三、4);
- ◆ Buffer CFDA含DNA吸附基质, 能有效去除细胞DNA (见page6-6图5);
- ◆ 无需添加Carrier RNA, 有效吸回收≥50 bp的DNA, 回收率约70-80% (见page6-5实验示例1);
- ◆ DNA吸附柱-L6, 可连接30 ml-扩容管, 负压抽滤快速完成DNA结合和洗涤步骤, 在台式离心机上完成洗脱步骤, 最小洗脱体积为25 μl。
- ◆ DNA吸附柱-CS, 最小洗脱体积为10 μl。

参考文献:

1. Bischoff FZ, Lewis DE, Simpson JL. Cell-free fetal DNA in maternal blood: Kinetics, source and structure. Hum Reprod Update 2005; 11: 59 - 67.
2. Gormally E, Hainaut P, Caboux E, et al. Amount of DNA in plasma and cancer risk: a prospective study. Int J Cancer 2004;111:746-9.
3. Rossa W. K. Chiu, et al. Effects of Blood-Processing Protocols on Fetal and Total DNA Quantification in Maternal Plasma. Clin Chem 2001; 47: 1607-1613.

二、试剂盒组成和储存

组成内容	DK607-01 (50 次) ^①	DK607-S-50 (50 次) ^②	DK607-T-4 (4 次) ^③	原理与用途
Buffer CFDA+	100 ml	12 ml	12 ml	释放 DNA, 去除>1 kb 的 DNA
Buffer CFDA-	25 ml	3 ml	3 ml	
Proteinase K*	1 ml×11	1 ml	1 ml	降解蛋白
Buffer CFD2	-	35 ml	5 ml	调整 DNA 结合条件
Buffer CFDB	500 ml	-	60 ml	调整 DNA 结合条件
Buffer BL	60 ml	-	5 ml	预处理 DNA 吸附柱-L6
Buffer CFD3	120 ml	15 ml×2	15 ml	洗涤去除蛋白
Buffer WB2 [‡]	65 ml	16 ml	16 ml	洗涤去除盐
30 ml-扩容管	10 个×5	-	4 个	扩大过柱体积
接头	50 个	-	4 个	连接 DNA 吸附柱至负压装置
DNA 吸附柱-L6	50 个	-	4 个	吸附 DNA(负压抽滤)
DNA 吸附柱-CS	-	50 个	4 个	吸附 DNA(离心过滤)
收集管	50 个	50 个×3	8 个×2	接收废液
1.5 ml 离心管(用于洗脱)	50 个	50 个	4 个×2	接收洗脱的 DNA
TE*	15 ml	15 ml	15 ml	洗脱 DNA
说明书	1 份	1 份	1 份	

第一次使用前将 Buffer CFDA-加入 Buffer CFDA+, 混合均匀, 两者混合后有效期为一个月。

①负压抽滤吸附 DNA, 每次处理≤2ml 样品; 处理更大体积的样品需订购 Buffer CFDA+、Buffer CFDA-、Buffer CFDB 和 Proteinase K。

②离心过滤吸附 DNA, 每次处理 200 μl 样品。

③试用包装, 同时提供负压抽滤的方式和离心过滤两种方式吸附 DNA 各 4 次提取量。

*Proteinase K: 30 mg/ml, 室温保存。可能会析出白色粉末状、絮状或晶体状不溶物, 不影响使用效果, 使用前混合均匀。

‡Buffer WB2: 第一次使用前, 按试剂瓶所示体积加入无水乙醇, 混合均匀。

*TE: 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0(25°C)。

试剂盒所有组成成分均于室温储存。

三、血浆分离、贮存

1. 普遍认为血液在凝固过程中发生凋亡释放 DNA 到血清中，因此从血浆中提取 cfDNA 更能反映生理或病理状态；推荐使用 EDTA-K₂ 作为抗凝剂。
2. 采血后应及时分离血浆，不然血细胞发生凋亡产生大量小片段 DNA，干扰后续实验。建议室温放置 1 小时或 2-8 °C 放置 3 小时之内进行血浆分离。
3. 推荐 2 次离心的方法分离血浆^[3]：4°C, 1,600g 离心 10 min 分离血浆勿触动白膜层；4°C, 16,000g 离心 10 min 仔细吸取上清。
如无低温离心条件，可将样品和离心管置于 2-8 °C 预冷后离心。
4. 血浆储存和运输过程中会产生血纤维(浑浊或出现絮状物)影响后续 DNA 提取，可能残留的血细胞会发生凋亡产生小片段 DNA。

血浆与 Buffer CFDA 混合后能避免 DNA 发生降解或水解；Proteinase K 能有效阻止血纤维的形成。

设血浆体积为 1V，加入 1V Buffer CFDA 和 1/20 V Proteinase K，按以下条件储存不影响提取效果：

室温(15-25°C)保存 3 天、2-8°C 保存 2 周、-20°C 长期保存

后续提取步骤：再加入 1/20 V Proteinase K，继续 page6-2 五、2 或 page6-3 六、2；

四、安全注意事项

Buffer CFDA、Buffer CFD2、Buffer CFDB 和 Buffer CFD3 含刺激性化合物，避免沾染皮肤、眼睛和衣服、谨防吸入口鼻。若沾染皮肤、眼睛，立即使用大量水或生理盐水冲洗沾染处，必要时寻求医疗咨询。

五、处理 200 µl 样品操作步骤（★为关键步骤）

所有离心条件为室温，12,000-16,000×g；如离心机只能设定转速，设定为低于最高转速 1,000 rpm。

DNA 吸附柱-CS 中加入溶液后可能会有白色纤维层从底部脱落悬浮于溶液中，不影响使用效果。

准备工作：

42°C 水浴；

第一次使用前将 Buffer CFDA-加入 Buffer CFDA+，在试剂瓶上注明溶液混合时间，有效期为一个月；溶液标记为 Buffer CFDA。

第一次使用前，按试剂瓶所示体积在 Buffer WB2 中加入无水乙醇，混合均匀。

1. 用力摇晃 Buffer CFDA 试剂瓶悬浮其中的基质，需在 5 分钟内完成加样，不然需再次悬浮。

在干净的 1.5 ml 离心管中加入 **200 µl 样品**、**180 µl Buffer CFDA** 和 **20 µl Proteinase K**，翻转离心管 10 次。

冻存的血浆可能会析出团块状血纤维，大部分 DNA 附着于血纤维，应用力摇晃分散血纤维或吸取血纤维用作 DNA 提取；

- ★ 2. 置于 42°C 水浴 30 min，温育期间摇晃混合一次-----!请勿延长温育时间

3. 离心 1 min。

4. 实验准备：可在步骤 2-3 实验间隙完成

用力摇晃 Buffer CFD2 试剂瓶悬浮其中的基质，需在 20 分钟内完成加样，不然需再次悬浮；

在干净的 1.5 ml 离心管中加入 **400 µl Buffer CFD2**；

将 DNA 吸附柱-CS 置于收集管中，按样品顺序做好标记。

5. 将步骤 3 的离心上清转入步骤 4 准备的离心管(已添加 Buffer CFD2)，缓慢吹打 3 次，转入 DNA 吸附柱-CS，离心 1 min。

将 DNA 吸附柱-CS 转入另一个干净的收集管。

6. 加入 **600 µl Buffer CFD3**，离心 1 min，将 DNA 吸附柱-CS 转入另一个干净的收集管。

7. 加入 **600 µl Buffer WB2**，离心 1 min，弃废液，将 DNA 吸附柱-CS 放回收集管。

8. 加入 **100 µl Buffer WB2**，离心 2 min。

9. 将 DNA 吸附柱-CS 转入试剂盒携带的 1.5 ml 离心管中，在硅胶膜中央加 ≥10 µl TE、1/10 TE 或去离子水，室温放置 1 min，离心 1 min。

洗脱液可以是 pH ≥7.0 的去离子水或低盐溶液，TE 有利于 DNA 的洗脱和保存。cfDNA 浓度低，后续反应中占体积比例较大，TE 可能会影响实验，建议用去离子水将 TE 稀释 10 倍后作为洗脱液。

六、处理 1-4 ml 样品操作步骤 (★为关键步骤)

准备工作:

42℃水浴;

第一次使用前将 Buffer CFDA-加入 Buffer CFDA+, 在试剂瓶上注明溶液混合时间, 有效期为一个月; 溶液标记为 Buffer CFDA。

第一次使用前, 按试剂瓶所示体积在 Buffer WB2 中加入无水乙醇, 混合均匀;

负压抽滤系统 (见 page6-4 图示):

真空泵: 建议购买AP-02B型无油真空/压力泵, 天津奥特赛恩斯仪器有限公司

负压装置: 建议购买AxyVac II 负压装置, Axygen

按表 1 准备合适规格的离心管。

表 1: 样品与试剂比例及所需离心管规格

样品体积	1V	0.9 ml	2 ml	2.5 ml	3 ml	3.5 ml	4 ml
Buffer CFDA(步骤 1)	0.9V	0.81 ml	1.8 ml	2.25 ml	2.7 ml	3.15 ml	3.6 ml
Proteinase K(步骤 1)	1/10V	90 μ l	200 μ l	250 μ l	300 μ l	350 μ l	400 μ l
Buffer CFDB(步骤 4)	3V	2.7 ml	6 ml	7.5 ml	9 ml	10.5 ml	12 ml
Proteinase K(步骤 4)	1/100V	9 μ l	20 μ l	25 μ l	30 μ l	35 μ l	40 μ l
离心管规格(步骤 1)		2-ml 尖底	15-ml 尖底	15-ml 尖底	15-ml 尖底	15-ml 尖底	15-ml 尖底
离心管规格(步骤 5)			15-ml			50-ml	

以下操作步骤以处理●0.9 ml 样品和■2 ml 样品为例, 处理其他体积样品请按表 1 所述比例调整试剂体积和离心管规格。

1. 摇晃 Buffer CFDA 试剂瓶悬浮其中的基质, 需在 5 分钟内完成加样, 不然需再次悬浮。

●在干净的 2 ml 离心管中加入 0.9 ml 样品、0.81 ml Buffer CFDA 和 90 μ l Proteinase K, 翻转离心管 10 次。

■在干净的 15 ml 离心管中加入 2 ml 样品、1.8 ml Buffer CFDA 和 200 μ l Proteinase K, 翻转离心管 10 次。

冻存的血浆可能会析出团块状血纤维, 大部分 DNA 附着于血纤维, 应用力摇晃分散血纤维或吸取血纤维用作 DNA 提取;

★2. 置于 42℃水浴 30 min, 温育期间摇晃混合一次-----!水浴应没过样品液面, 使样品充分加热, 请勿延长温育时间

3. ●室温 12,000×g 离心 1 min。

■室温 2,000×g, 离心 10 min。

4. 在步骤 2-3 实验间隙完整以下准备工作(负压抽滤系统组装见 page6-4 图示):

摇晃 Buffer CFDB 试剂瓶悬浮其中的基质, 需在 20 分钟内完成加样, 不然需再次悬浮;

●在干净的 15 ml 离心管中加入 2.7 ml Buffer CFDB 和 9 μ l Proteinase K;

■在干净的 15 ml 离心管中加入 6 ml Buffer CFDB 和 20 μ l Proteinase K;

将接头连接至负压装置;

将 DNA 吸附柱-L6 置于收集管中, 按样品顺序标记 DNA 吸附柱-L6;

将 30 ml-扩容管连接至 DNA 吸附柱-L6, 连接至接头;

连接负压装置-缓冲瓶-真空泵, 开启真空泵, 调整负压至 70 kPa 或 Max;

在 30 ml-扩容管中加入 1 ml Buffer BL, 保持负压, 使溶液完全滤过。

在 30 ml-扩容管中加入 1 ml Buffer CFDB, 保持负压, 使溶液完全滤过。

★5. 将步骤 3 的离心上清转入步骤 4 准备的离心管(已添加 Buffer CFDB 和 proteinase K), 用力摇晃 3 次; 转入步骤 4 准备的 30 ml-扩容管, 保持负压, 使溶液完全滤过-----!溶液与 Buffer CFDB 混合后应及时进行负压抽滤, 如放置时间过长会影响产量和溶液滤过速度
卸下 30 ml-扩容管, 并丢弃(见 page6-4 图示)。

6. 在 DNA 吸附柱-L6 中加入 600 μ l Buffer CFD3, 保持负压, 使溶液完全滤过; 重复此步骤 1 次。

7. 在 DNA 吸附柱-L6 中加入 800 μ l Buffer WB2, 保持负压, 使溶液完全滤过; 重复此步骤 1 次。

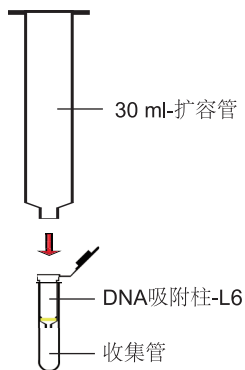
8. 关闭真空泵, 释放负压, 卸下 DNA 吸附柱-L6, 丢弃接头, 将 DNA 吸附柱-L6 转入收集管, 室温 12,000×g 离心 2 min。

卸下 DNA 吸附柱-L6 时应注意避免交叉污染。

9. 将 DNA 吸附柱-L6 转入试剂盒携带的 1.5 ml 离心管中, 在硅胶膜中央加 \geq 25 μ l TE、1/10 TE 或去离子水, 放置 2 min, 室温 12,000×g 离心 1 min。

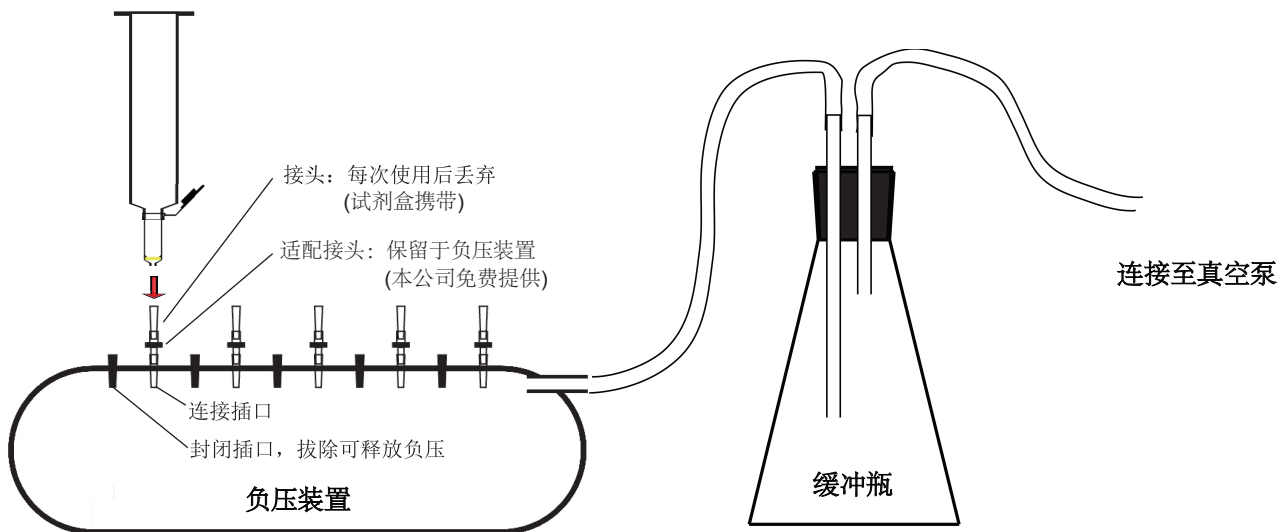
洗脱液可以是 pH \geq 7.0 的去离子水或低盐溶液, TE 有利于 DNA 的洗脱和保存。cfDNA 浓度低, 后续反应中占体积比例较大, TE 可能会影响实验, 建议用去离子水将 TE 稀释 10 倍后作为洗脱液。

七、负压抽滤系统组装与拆卸图示

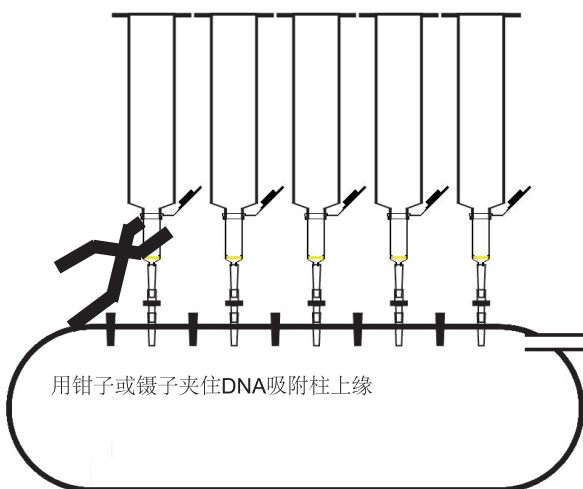


负压抽滤系统组装:

- 将接头连接至负压装置;
- 将DNA吸附柱-L6置于收集管中,按样品顺序标记DNA吸附柱-L6;
- 将30 ml-扩容管连接至DNA吸附柱-L6;
- 将DNA吸附柱-L6连同30 ml-扩容管连接至接头;
- 连接负压装置-缓冲瓶-真空泵。

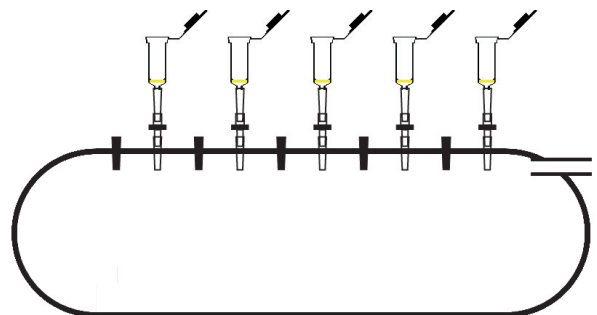


旋转拧下30ml-扩容管



卸除30 ml-扩容管:

- 用钳子或镊子夹住DNA吸附柱-L6上缘;
- 旋转拧下30 ml-扩容管。



八、cfDNA 初步检测

cfDNA 含量甚微，浓度低于 Nanodrop 等微量分光光度计和常规琼脂糖凝胶电泳检测下限，建议使用 Qubit 荧光计测定总 DNA 浓度，使用 Agilent Bioanalyzer 2100 电泳并测定区域 DNA 浓度。如存在大量细胞 DNA，前者明显高于后者，两者的比例可作为判断能否进行后续实验的依据之一。

改进琼脂糖凝胶电泳方法可观察 178 bp 核小体单位 DNA，同时能判断是否有细胞核染色体 DNA 残留。电泳详细方法：www.lifefeng.com，下载中心 || 技术手册 || 琼脂糖凝胶电泳鉴定游离 DNA。

实验示例 1: 从 1-5 ml 血浆中提取 DNA 与估算回收率

样品准备:

血浆: 使用 EDTA-K₂ 采血管收集 50 ml 正常人血液，两次离心的方式获得约 20 ml 血浆。

245 bp DNA: 使用微量 DNA 快速回收试剂盒 (DK404) 纯化 245 bp PCR 产物，根据 Nanodrop 定量稀释至 0.5 ng/μl。

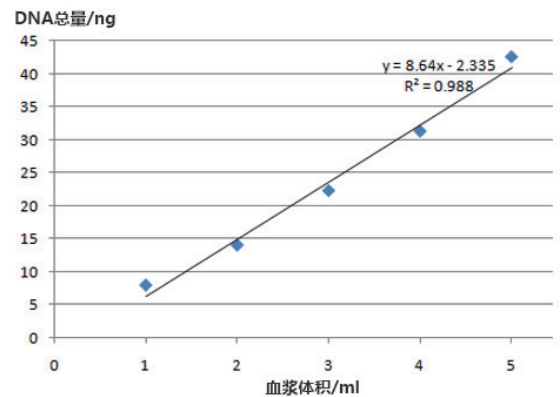
25 μl 245 bp DNA 加入 975 μl 血浆中，总量约 13 ng;

其浓度与和长度与正常人血浆中游离 DNA 相似，考察其回收率可间接估算游离 DNA 的提取效率。

实验参数:

样品	负压抽滤时间 (步骤六.6)	Qubit 定量 (ng/μl)	DNA 总量 (ng)
245 bp DNA		0.491	12.28
975 μl 血浆 加 25 μl 245 bp DNA	2' 12"	0.695	17.38
1 ml 血浆	2' 10"	0.317	7.93
2 ml 血浆	4' 52"	0.56	14
3 ml 血浆	8' 30"	0.89	22.25
4 ml 血浆	12' 12"	1.25	31.25
5 ml 血浆	35' 55"	1.7	42.5

洗脱体积: 25 μl

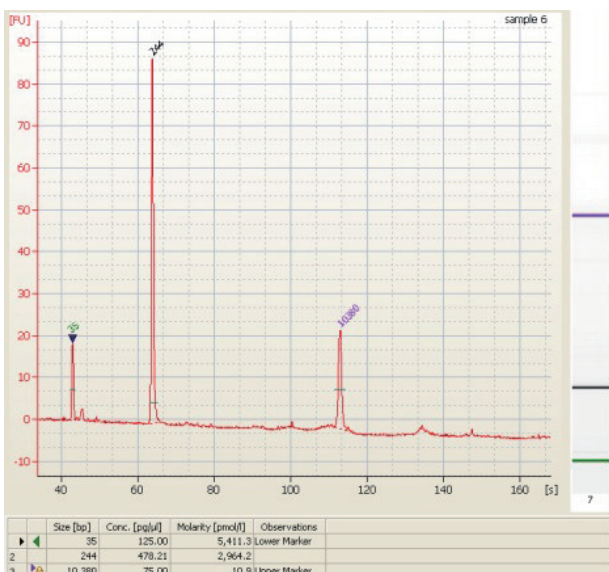


实验讨论 1: 起始血浆体积与 DNA 产量可呈线性关系;

实验讨论 2: 处理 5 ml 血浆负压抽滤时间较长, DNA 吸附柱已出现堵塞的情况, 在极端条件下可能会出现溶液无法完全滤过的情况; 因此限定本方法处理血浆体积的上限为 4 ml;

实验讨论 3: 回收率 = (额外加入 DNA 的血浆提取量 - 未加入 DNA 的血浆提取量) / 加入 DNA 的总量 = (17.38 - 7.93) / 12.28 = 77%

Agilent Bioanalyzer 2100 电泳鉴定回收率

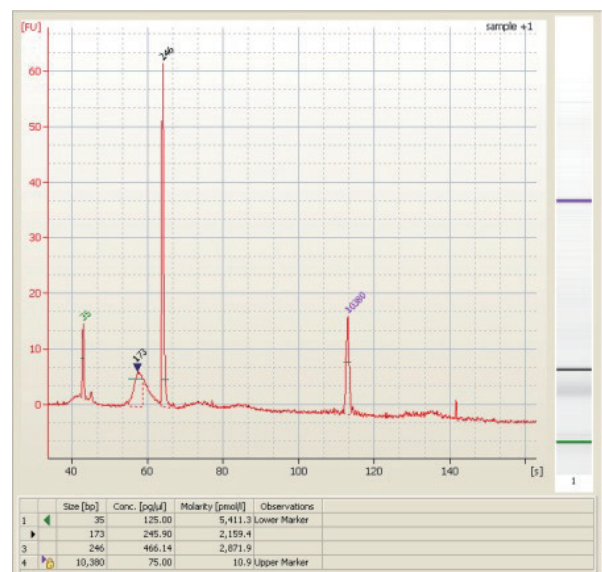


↑ 图 1: 245 bp DNA (Qubit 定量 0.491 ng/μl)

245 bp 区域浓度为 0.478 ng/μl, 与 Qubit 定量接近

荧光值(FU): 85

根据荧光值(FU)估算回收率 = 61 / 85 = 71.8%

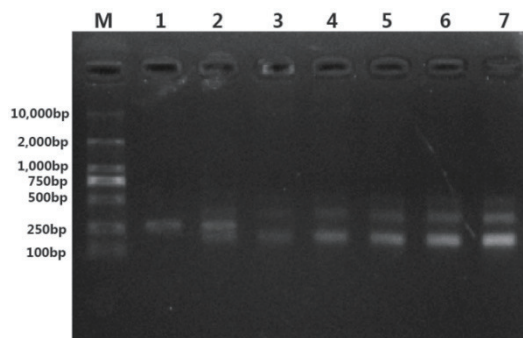


↑ 图 2: 起始样品为 975 μl 血浆加 25 μl 245 bp DNA

245 bp 区域浓度为 0.466 ng/μl, 可能是相邻峰干扰导致数值偏高

荧光值(FU): 61

琼脂糖凝胶电泳



←图 3. 琼脂糖凝胶电泳

1.5% agarose, EB 用电泳缓冲液稀释至 1 mg/ml, 在 50 ml 凝胶中加入 1 μ l 6.7V/cm 15 min;

M: DL2000+10kb, 稀释 10 倍, 电泳 1 μ l, 750 bp 约 2 ng, 其余条带约 1 ng;
1-7 电泳体积 3 μ l;

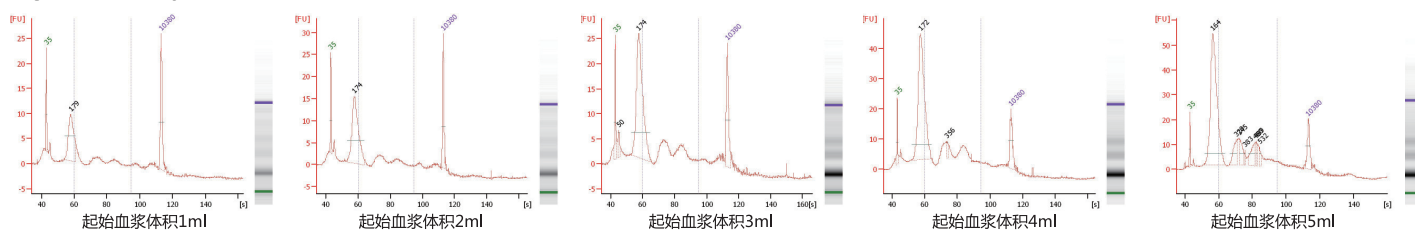
1: 245 bp DNA 片段;

2: 起始样品为 975 μ l 血浆加 25 μ l 245 bp DNA

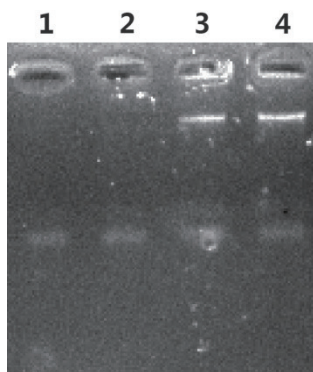
3-7: 起始血浆体积分别为 1ml、2ml、3ml、4ml 和 5ml

琼脂糖凝胶电泳未观察到明显的细胞 DNA 残留, 说明 Qubit 定量数据能相对准确反应游离 DNA 的量。

Agilent Bioanalyzer 2100 电泳鉴定 1-5ml 血浆中提取的 DNA



实验示例 2: 考察 Buffer CFDA 去除细胞 DNA



←图 4: Buffer CFDA 去除细胞 DNA

0.9 ml 自然沉降分离的血浆, 25 μ l 洗脱, 3 μ l 电泳

1、2: 按说明书操作

3、4: 去除 Buffer CFDA 中的基质

九、常见问题解答

Q1 步骤六.5 负压抽滤速度太慢

A1-1 真空泵最大负压应大于 70 kPa

A1-2 检查连接管、缓冲瓶、负压装置的密封性

A1-3 步骤六.1, Buffer CFDA+与 Buffer CFDA-混合后时间超过 1 个月

A1-4 步骤六.5, Buffer CFDB 与离心上清混合后放置时间过久 (超过 10 min) 会导致部分蛋白析出堵塞 DNA 吸附柱, 从而影响溶液滤过速度。

Q2 明显的基因组 DNA 残留

A2-1 未充分悬浮 Buffer CFDA 中的基质

A2-2 每毫升 Buffer CFDA 中的基质吸附完整基因组 DNA 的上限约 1 μ g, 如分离的血浆中含大量白细胞或分离血浆时已发生明显的溶血现象, 血浆中完整的基因组 DNA 含量可能会超过基质吸附能力的上限, 从而导致基因组 DNA 残留。